

Bloedstolling

Citation for published version (APA):

Rosing, J. (1998). *Bloedstolling: een leven lang van levensbelang*. Maastricht University.
<https://doi.org/10.26481/spe.19981023jr>

Document status and date:

Published: 23/10/1998

DOI:

[10.26481/spe.19981023jr](https://doi.org/10.26481/spe.19981023jr)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Bloedstolling: een leven lang van levensbelang

Rede

in verkorte vorm uitgesproken op vrijdag 23 oktober 1998 bij de
aanvaarding van het ambt van bijzonder hoogleraar
Enzymologie van Trombose en Hemostase

vanwege de Stichting Wetenschapsbeoefening Universiteit
Maastricht aan de Faculteit der Geneeskunde van de
Universiteit Maastricht

Dr. J. Rosing

De leerstoel Enzymologie van Trombose en Hemostase is ingesteld door de Stichting Wetenschapsbeoefening Universiteit Maastricht op voordracht van het Cardiovasculair Research Instituut Maastricht (CARIM)

Voor Sjoukje, Muriël en Justin

De gehele wetenschap is niets meer dan
een verfijning van het dagelijks denken
Albert Einstein

Mijnheer de Rector Magnificus,
Zeer gewaardeerde Toehoorders,

Toen in de zomer van 1997 de Universiteit van Maastricht mij de vererende mededeling deed dat zij besloten had mij te benoemen tot hoogleraar in de Enzymologie van de Trombose en Hemostase werd mij tevens gevraagd of ik bereid was binnen niet al te lange tijd een oratie te houden. Het feit dat er inmiddels meer dan een jaar voorbij is wordt niet veroorzaakt door een gebrek aan gespreksstof, maar ik heb gewacht tot de 23^e oktober aangezien het vandaag precies 24 jaar geleden is dat ik aan de Universiteit van Amsterdam gepromoveerd ben.

Gezien de titel van mijn proefschrift vraagt U zich misschien af hoe het mogelijk is dat een biochemicus, gespecialiseerd in thermodynamica en mechanisme van de oxidatieve fosforylering, benoemd kan worden tot hoogleraar aan een Medische Faculteit. Het is de bedoeling van deze oratie hier helderheid over te verschaffen en daarom zal ik trachten U in de komende 45 minuten uit te leggen welke betekenis mijn vak, de biochemie, heeft voor de geneeskunde en gezien het aandachtsgebied van mijn benoeming voor het onderzoek in trombose en hemostase in het bijzonder.

De biochemie is een onderdeel van de scheikunde, wat zich bezig houdt met de bestudering van de omzettingen van chemische stoffen in levende organismen. In feite stond de wieg van de biochemie in Nederland. In het begin van de negentiende eeuw ontdekte de Nederlandse arts G.J. Mulder namelijk dat verhitting van weefselextracten van dieren resulteerde in de vorming van een vezelachtige substantie, die bestond uit de elementen koolstof, waterstof, zuurstof en stikstof. Op basis van die bevinding concludeerde Mulder in 1838 dat deze

verbindingen, die hij proteïnen noemde, de belangrijkste bouwstenen zijn van levende materie.

Proteïnen, die ik vanaf nu eiwitten of enzymen zal noemen, zijn niet alleen bouwsteen van levende organismen doch hebben ook een belangrijke functie in de regulatie van de chemische processen die zich in levende materie afspelen.

In een cel zijn meer dan 1000 verschillende chemische reacties mogelijk, die op enkele na, echter niet spontaan verlopen. Deze chemische reacties worden versneld, gereguleerd en op elkaar afgestemd door de aanwezigheid van biokatalysatoren of enzymen. Vrijwel elke reactie in de cel wordt gekatalyseerd door een voor die reactie specifiek enzym en dat betekent dat er zich in elke cel evenveel verschillende enzymen bevinden als er chemische reacties mogelijk zijn.

Eiwitten en enzymen zijn niet de enige biomoleculen. Daarnaast komen er in levende organismen andere belangrijke chemische verbindingen zoals koolhydraten, lipiden, en nucleïnezuuren voor.

Bestudering van de structuur, functie en chemische omzettingen van deze biomoleculen vond tot de tweede wereldoorlog veelal plaats aan Medische Faculteiten als onderdeel van de fysiologie en oorspronkelijk noemde men dit onderzoeksgebied dan ook fysiologische scheikunde. Pas na de tweede wereldoorlog werd de naam biochemie geïntroduceerd en werd dit vakgebied veelal geïntegreerd in de Faculteiten der Wiskunde en Natuurwetenschappen. Hiermee werd de wisselwerking tussen biochemisch en medisch onderzoek echter geenszins verbroken. De laatste jaren wordt steeds duidelijker dat de relatie tussen de biochemie en de geneeskunde in feite tweerichtingsverkeer is, waarin de biochemie belangrijke inzichten verschaft in de moleculaire basis van gezondheid en ziekte en de bestudering van klinische

vraagstellingen nieuwe onderzoeksgebieden opent voor de biochemicus. Een aantal van de onderzoeksthema's waarop men binnen deze medische faculteit werkzaam is, zijn een voorbeeld van dit tweerichtingsverkeer.

Aangezien de wisselwerkingen tussen koolhydraten en diabetes, lipiden en atherosclerose en nucleïne-zuren en erfelijke ziekten al aan de orde zijn gekomen in eerdere oraties aan deze Universiteit zal ik me, in het kader van mijn benoeming beperken tot de relatie tussen eiwitten en trombose en hemostase.

Hemostase en trombose: een historisch overzicht.

Ieder van ons weet dat wanneer er bij een verwonding bloedvaten beschadigd worden en bloed uit de wond ontsnapt, de bloeding na enkele minuten als ware het vanzelf weer tot stilstand komt. Hoewel de bloedstelping, ook wel hemostase genoemd, door vrijwel iedereen als vanzelfsprekend ervaren wordt, verloopt dit proces volgens ingewikkelde biochemische principes.

Reeds in de Griekse oudheid nam men waar dat zich in geronnen bloed een draderige en kleverige substantie bevond, die later fibrine werd genoemd. Eeuwen lang heeft men zich afgevraagd hoe het mogelijk was dat fibrine in een oplosbare vorm voorkomt wanneer het bloed zich in de bloedvaten bevindt en onoplosbare draden vormt, nadat het bloed het lichaam verlaten heeft.

Pas in het midden van de 19^e eeuw werd een doorbraak bereikt toen verschillende onderzoekers zich realiseerden dat trombose, dat wil zeggen de ongewenste vorming van een bloedpropje of trombus in de bloedbaan, via dezelfde processen verloopt als het stelpen van een bloeding.

De Duitse patholoog Virchow stelde rond 1860 voor¹ dat zowel bloedstolling als trombose een gevolg zijn van veranderingen in de vaatwand, het bloed en in de stromingssnelheid van bloed. Deze Trias van Virchow, die heden ten dage nog steeds actueel is, vormde in feite de start van biochemisch onderzoek van de bloedstolling. Op basis van een serie elegante experimenten van Buchanan, Schmidt en de Nederlandse patholoog-anatoom Pekelharing werd vastgesteld dat de bloedstolling gekatalyseerd wordt door eiwitten aanwezig in het bloed en in 1904 stelde Morawitz² een stollingschema voor wat uit twee stappen bestond:

In de eerste stap wordt het in het bloed voorkomende eiwit protrombine door trombokinase omgezet in het enzym trombine wat in de tweede stap van het stollingproces het oplosbare fibrinogeen via een chemische reactie omzet in onoplosbaar fibrine. In feite vertoont dit mechanisme reeds de contouren van wat wij tegenwoordig kennen als de enzymcascade die verantwoordelijk is voor de stolling van bloed.

Reeds ten tijde van Morawitz realiseerde men zich dat dit schema de gebeurtenissen die optreden tijdens de stolling van bloed slechts gedeeltelijk weergeeft. Parallel aan het onderzoek van een op enzymwerking berustend stollingsproces werd namelijk de rol van de cellulaire bestanddelen van bloed in de stolling bestudeerd. In het midden van de 19^e eeuw ontdekte men dat er in het bloed kleine cellen voorkomen die als eigenschap hebben dat zij gemakkelijk van vorm veranderen en vervolgens aan elkaar kleven.

In 1882 publiceerde Bizzozero³ dat deze cellen, die hij trombocyten noemde, een belangrijke rol speelden in de trombusvorming en in de stolling van bloed. Hierdoor ontstond een discussie of bloedstelping een gevolg is van enzymwerking

van eiwitten aanwezig in bloed of van verkleving en agglutinatie van cellulaire bestanddelen. Aan het begin van deze eeuw werd men het erover eens dat stollingseiwitten en trombocyten beiden van essentieel belang zijn voor de effectieve stelping van een bloeding. Dit resulteerde tenslotte in een schema voor de stolling van bloed waar we heden ten dage nog steeds mee werken.

Bij de beschadiging van een bloedvat komen stoffen vrij die reacties aangaan met zowel de in het bloed circulerende trombocyten als met stollingseiwitten. Het in de vaatwand aanwezige collageen bindt de langsstromende trombocyten, die vervolgens van vorm veranderen en aggregeren tot wat een primaire trombus genoemd wordt. Deze primaire trombus, die de eerste dichtung van het beschadigde bloedvat verzorgt, is echter zeer instabiel en valt weer gemakkelijk uit elkaar. Gelukkig wordt de primaire trombus bij gezonde mensen verstevigd door reacties, die optreden tussen de niet-cellulaire bestanddelen van bloed, de stollingsfactoren. Bij de vaatwandbeschadiging wordt het bloed namelijk niet alleen aan collageen blootgesteld, maar wordt tevens een factor uit het beschadigde weefsel vrijgemaakt die de bloedstolling initieert. Dit resulteert uiteindelijk in de vorming van trombine, de omzetting van fibrinogeen in onoplosbare fibrinevezels die via sterke interacties met geaggregeerde bloedplaatjes de primaire trombus verstevigen tot een stabiele trombus, waarmee de definitieve dichtung van de beschadigde vaatwand een feit geworden is.

De reacties tussen bloedplaatjes enerzijds en stollingsfactoren anderzijds verlopen echter niet onafhankelijk van elkaar. Tegenwoordig weten we dat geactiveerde bloedplaatjes de vorming van trombine sterk bevorderen⁴ en dat trombine een

belangrijke rol speelt in de activering en aggregatie van bloedplaatjes⁵.

Gezien de tijd zal ik mij beperken tot een verdere bespreking van de ontrafeling van het klassieke stollingsmechanisme en de rol die de biochemie hierin heeft gespeeld.

Door middel van patiënt-gebonden onderzoek werden in de in de eerste helft van deze eeuw een groot aantal verschillende eiwitten ontdekt die betrokken zijn bij de stolling van bloed. In de jaren zestig werden door Mac Farlane⁶ en Davie en Ratnoff⁷ de stukjes van de legpuzzel van de bloedstolling bij elkaar gelegd en zij stelden onafhankelijk van elkaar voor dat de stolling verliep via een zogenaamd cascade mechanisme waarbij tenminste acht verschillende plasma-eiwitten betrokken zijn. Hoewel dit schema er voor de leek vrij ingewikkeld uitziet, vormden de publicaties van Mac Farlane, Davie en Ratnoff het startpunt voor de introductie van biochemie in het stollings-onderzoek.

De rol van de biochemie in hemostase en trombose onderzoek.

Voordat de biochemicus echter kan beginnen met zijn onderzoek dient hij de eiwitten die hij wil bestuderen te zuiveren en in geïsoleerde vorm, zonder aanwezigheid van andere eiwitten, in handen te krijgen. In het geval van de bloedstolling doet zich hier echter een probleem voor.

Bloed, waaruit de cellen verwijderd zijn, bevat ongeveer 70 g eiwit per liter en maar een zeer klein deel hiervan is betrokken bij de bloedstolling. Zo bevindt zich in een liter bloed slechts 7.5 mg stofactor V wat maar 0.01% is van het totaal aanwezige eiwit. Dat betekent dat het zuiveren van factor V te vergelijken is met het zoeken naar een speld in een hooiberg. Van elke

10.000 eiwitmoleculen aanwezig in bloed is er slechts één een factor V molecuul en voor het verkrijgen van gezuiverd factor V dienen die andere 9999 eiwitmoleculen verwijderd te worden. Gelukkig zijn de methoden voor de zuivering van eiwitten de afgelopen 20 jaar aanzienlijk verbeterd en is het tegenwoordig mogelijk alle stollingsfactoren uit bloed te zuiveren en hun onderlinge reacties en interacties te bestuderen.

In biochemische zin heeft het voorstel van Davie en Mac Farlane de bloedstolling aanzienlijk vereenvoudigd. Elke afzonderlijke stap in de stollingscascade berust namelijk op een biochemisch principe wat veel overeenkomsten vertoont met de reacties die optreden tijdens de omzetting van de spijsverteringsenzymen chymotrypsinogeen en trypsinogeen in de actieve proteolytische enzymen chymotrypsine en trypsin.

Zowel stolfactoren als spijsverteringsenzymen worden uitgescheiden in een niet actieve vorm en worden op het moment dat het nodig is omgezet in een actief eiwit-splitsend enzym. Er is echter één belangrijk verschil tussen de activering van spijsverteringsenzymen en stolfactoren en dat is dat voor stolfactoractivering de aanwezigheid van co-factoren essentieel is⁸. De betekenis van deze co-factoren werd duidelijk na gedetailleerde kinetische analyse van de stolfactoractivering⁹⁻¹².

We weten nu dat de volledige omzetting van het in bloed aanwezige protrombine in trombine door factor Xa alleen enkele dagen in beslag neemt. In aanwezigheid van de co-factoren factor Va of fosfolipiden wordt deze tijd ingekort tot enkele uren. Pas wanneer fosfolipiden en factor Va beiden aanwezig zijn wordt trombine gevormd met een snelheid die het mogelijk maakt een bloeding binnen enkele minuten te stoppen.

Het biochemisch onderzoek heeft niet alleen de fysiologische betekenis van de co-factoren aangegeven maar heeft tevens

inzicht verschaft in de moleculaire mechanismen van stolfactoractivering⁹⁻¹².

De langzame stolfactoractivering in afwezigheid van co-factoren wordt verklaard door het feit dat bloed slechts zeer geringe hoeveelheden stolfactoren bevat. Daardoor is de kans dat de stolfactor en het enzym elkaar te midden van honderdduizenden andere eiwitmoleculen vinden zeer klein. Dit betekent dat onder fysiologische omstandigheden de stolfactor en het enzym slechts zelden een interactie aangaan en dat zonder co-factoren de activering van stolfactoren een zeldzame gebeurtenis is.

Dit verandert in aanwezigheid van co-factoren. Zowel de te activeren stolfactor, het enzym, als de eiwit co-factor binden aan negatief geladen fosfolipide membranen. Deze binding resulteert in een verhoging van de locale eiwit concentraties aan het lipide oppervlak hetgeen de vorming van stolfactor-enzym-cofactor complexen sterk bevordert en leidt tot een meer dan 100.000-voudige versnelling van de stolfactor activering. In dit complex heeft de eiwit co-factor in het algemeen drie functies: Het treedt op als een soort receptor die zowel de stolfactor als het enzym naar het membraan oppervlak trekt en daarnaast verhoogt de cofactor de proteolytische activiteit van het enzym waardoor dit in staat is de stolfactor met een 1000-maal hogere snelheid te activeren⁹⁻¹².

Hemostase of trombose?

De biochemische studies van de afgelopen 20 jaar toonden aan dat de chemische reacties van de bloedstolling zeer efficiënt verlopen en dat de stolling, wanneer deze eenmaal opgang gekomen is, leidt tot een explosieve trombinevorming en een snelle en effectieve dichting van de beschadigde vaatwand.

Wanneer we hier echter goed over nadenken zien we ook meteen het gevaar van een dergelijk proces in. Trombine mag slechts werkzaam zijn zolang de vaatwandbeschadiging nog niet hersteld is, maar zodra deze een feit is dient trombine tot de orde worden geroepen zodat verdere uitbreiding van het stolsel en een dreigende verstopping van het bloedvat voorkomen wordt. Tevens dienen trombine moleculen die met de bloedstroom ontsnappen onschadelijk gemaakt te worden voordat zij elders in de bloedbaan ongewenste stolsels kunnen gaan vormen.

Het is daarom niet verwonderlijk dat er in het bloed een drietal mechanismen opereren die er voor zorgen dat de vorming van het stolsel in toom gehouden wordt. In de eerste plaats beschikt het organisme over een enzymstelsel, de fibrinolyse, wat in staat is eenmaal gevormde stolsels weer af te breken en te verwijderen¹³. Daarnaast bevat het bloed een aantal remmers, die trombine, nadat het zijn dienst bewezen heeft, onschadelijk maken^{14,15}. Tenslotte werd in 1976 het zogenaamde proteïne C systeem ontdekt^{16,17}, een mechanisme waarmee een eenmaal gestarte trombinevorming weer afgeremd wordt. Dit systeem wordt door trombine zelf aangezet. Trombine zet het plasma eiwit proteïne C om in geactiveerd proteïne C, afgekort APC, wat op zijn beurt in staat is factor Va, een stolfactor essentieel voor de vorming van trombine, te inactiveren. Hiermee roept trombine in feite zijn eigen vorming een halt toe en blijft de trombinegeneratie en de vorming van het stolsel beperkt tot het gebied van de wond.

Een exact op elkaar afgestemde samenwerking tussen de stollings- en antistollingseiwitten zorgt er voor dat gezond bloed niet stolt in gezonde bloedvaten en dat bij een vaatwandbeschadiging het hemostase proces beperkt blijft tot

het gebied van de wond. Verstoring van de hemostase balans leidt tot een pathologische situatie. Een tekort aan stollingsfactoren gaat gepaard met vertraagde bloedstolling en een bloedingsneiging. Hyperactiviteit van stollingseiwitten of defecten in het antistollingssysteem kunnen de balans in de andere richting doen doorslaan en leiden tot ongewenste vorming van bloedstolsels en trombose.

Pathologische defecten komen echter veel vaker voor in het antistollingssysteem dan in het stollingssysteem. Voor elke patiënt die overlijdt tengevolge van een gebrekkig stollingsmechanisme en een oncontroleerbare bloeding, sterven er duizenden als gevolg van het feit dat hun bloed niet vloeibaar blijft in de vitale delen van het vaatstelsel.

Betekenis van Hart- en Vaatziekten

Een verhoogde tromboseneiging is zonder twijfel nog steeds de belangrijkste doodsoorzaak in de westerse wereld. Bijna de helft van de sterfgevallen in West-Europa zijn een gevolg van de complicaties die kunnen optreden bij hart- en vaatziekten en jaarlijks overlijden er in Nederland ongeveer 50.000 mensen als gevolg van een cardio-vasculaire aandoening. Hoewel het directe verband tussen hart- en vaatziekten en de bloedstolling niet altijd herkend wordt, wordt de laatste jaren steeds duidelijker dat bij manifeste storingen in het hart- en vaatstelsel zoals ischemische hartziekten, hartinfarct, beroerte en longembolie de bloedstolling een belangrijke component is.

Aderverkalking, ook wel atherosclerose genoemd, de meest voorkomende oorzaak van ischemische hart- of hersenziekte, is op zich zelf zelden fataal en complicaties bij atherosclerose zijn meestal een gevolg van acute trombotische processen, die plaats vinden aan het oppervlak van de atherosclerotische plaque.

Op grond van de lokalisatie van trombose wordt er in ons vakgebied een indeling gemaakt in veneuze en arteriële trombose. Verschillen in de samenstelling van de arteriële trombus, die voornamelijk uit bloedplaatjes bestaat en de veneuze trombus die bestaat uit een draderige fibrinemassa en het feit dat er geen verband lijkt te bestaan tussen de risicofactoren voor arteriële en veneuze trombose hebben lange tijd steun gegeven aan het idee dat de bloedstolling van onderschikte betekenis is in het ontstaan van arteriële trombose. De risicofactoren voor arteriële trombose, zoals hoge bloeddruk, roken en verkeerde voeding geven aan dat vaatwandveranderingen een belangrijke rol spelen in het arterieel trombotische proces terwijl de risicofactoren voor veneuze trombose zoals trauma, pilgebruik, zwangerschap en een aantal erfelijke tromboserisico's^{15,18-20} veelal geassocieerd zijn met hyperactiviteit van het stollingsproces.

Echter, het feit dat dezelfde therapie effectief is in de acute fase van zowel arteriële als veneuze trombose en dat deze therapie veelal gebaseerd is op remming van de trombinevorming of van trombine zelf en de toenemende klinische en experimentele aanwijzingen dat verhoogde activiteit van het stollingssysteem zoals een toename van fibrinogeen, weefselfactor, factor VII of factor VIII het risico op een hart- en herseninfarct verhogen²¹, geven aan dat het stollingssysteem ook een belangrijke rol speelt in de ontwikkeling van arteriële trombose. Ik verwacht dat deze associatie in de toekomst alleen maar duidelijker zal worden en dat in cardio-vasculaire onderzoekscentra met toenemende inspanning onderzoek verricht zal worden naar de betekenis van bloedstolling in arteriële trombose.

Alhoewel ik hoop dat U er inmiddels van overtuigd bent dat biochemisch onderzoek een belangrijke rol zal spelen in deze ontwikkeling wil ik toch nog graag met een voorbeeld aangeven dat de uitkomsten van biochemisch onderzoek niet altijd beperkt blijven tot een laboratorium situatie maar dat er op verschillende momenten een brug geslagen kan worden tussen fundamenteel biochemisch en klinisch-relevant onderzoek. In plaats van U te overweldigen met een groot aantal voorbeelden uit de literatuur, zal ik dit, met het risico dat deze oratie de indruk wekt dat er slechts in Maastricht belangrijk stollings-onderzoek wordt verricht, toelichten aan de hand van een voorbeeld uit mijn eigen laboratorium.

In 1993 ontdekte Dahlbäck²⁰ dat families, ongevoelig voor de werking van het anticoagulante eiwit APC, een verhoogde kans hebben op veneuze trombose. Ruim 1 jaar later rapporteerden verschillende onderzoekers²²⁻²⁵ dat APC resistentie veroorzaakt wordt door een verandering in het erfelijk materiaal wat codeert voor stollingsfactor Va. Deze mutatie resulteert in de vervanging van een aminozuur op een belangrijke splitsingsplaats voor APC. Hierdoor remt APC de trombinevorming minder goed en worden er bij mensen met een afwijkend factor V, wat ik vanaf nu factor V_{Leiden} zal noemen, gemakkelijker stolsels gevormd en ontstaat er sneller trombose. APC resistentie is een veel voorkomende erfelijke afwijking. In ons land is ongeveer 5% van de bevolking APC resistent en dat betekent dat er zich, statistisch gezien, onder de aanwezigen in deze aula ongeveer 10 mensen bevinden met deze erfelijke afwijking.

Tijdens onderzoek aan factor V_{Leiden} in ons laboratorium realiseerden wij ons dat de kennis met betrekking tot de afwijkende eigenschappen van factor V_{Leiden} gebruikt kon

worden voor de ontwikkeling van een diagnostische test, die de opsporing van mensen met deze erfelijke afwijking mogelijk maakt.

Deze test²⁶, die gebaseerd is op het kwantificeren van het effect van APC op de trombinevorming, maakt een goed onderscheid tussen mensen zonder en met factor V_{Leiden}. Tijdens het onderzoek werden echter twee proefpersonen ontdekt, zonder de factor V_{Leiden} mutatie, die een zelfde resistentie tegen APC vertoonden als dragers van de erfelijke afwijking. Onze aandacht werd getrokken toen we er achter kwamen dat beide proefpersonen vrouwen waren die de anticonceptiepil gebruikten. Het was namelijk reeds lang bekend dat vrouwen die “de pil” slikken een verhoogd risico op veneuze trombose hebben en juist op het moment van onze bevindingen was de pil weer in het nieuws.

In de herfst van 1995 werd namelijk gerapporteerd dat, geheel tegen de verwachting in, gebruiksters van de nieuwere zogenaamde derde generatiepil blootgesteld zijn aan een twee tot driemaal zo hoog trombose risico dan vrouwen die de oudere tweede generatie pil gebruiken²⁷⁻³¹. Toen wij hiervan kennis namen besloten wij ons pilonderzoek uit te breiden en bloedmonsters van een groot aantal vrouwen die de tweede of de derde generatie pil slikten te testen op resistentie tegen APC.

Deze studie, die inmiddels afgerond is³², gaf aan dat pilsliksters, onafhankelijk van het soort pil, resistentier waren tegen de anti-stollende werking van APC dan vrouwen die geen pil gebruikten en wat mogelijk nog belangrijker was, dat APC de bloedstolling minder effectief remde bij derde generatie pilgebruiksters dan bij gebruiksters van de tweede generatie pil. Op basis van deze waarnemingen stelden wij voor dat

pilgebruik verworven APC resistentie veroorzaakt, een defect wat veel overeenkomsten vertoont met de resistentie tegen APC die optreedt in families met factor V_{Leiden} . Daarnaast hypotheetiseerden we dat verworven APC resistentie heel goed het verhoogde trombose risico van pilgebruiksters en de risicoverschillen tussen de tweede en derde generatie pil zou kunnen verklaren.

Een aantal epidemiologen, betrokken bij de discussies rond de tromboserisico's van de anticonceptiepil werd zeer enthousiast toen zij kennis namen van onze waarnemingen. De reden hiervoor was dat er een opmerkelijke verband bleek te bestaan tussen onze resultaten en de risicotoename voor veneuze trombose. Vrouwen, die de derde generatiepil gebruiken geven een testresultaat wat vergelijkbaar is met dat van heterozygote dragers van factor V_{Leiden} en epidemiologische studies hebben een zelfde risicotoename aangegeven voor beide populaties. Het verband tussen testresultaat en trombose risico werd nog duidelijker bij vergelijking van heterozygote pilsluksters en homozygoten die de pil niet slikken. Ook in deze groepen bleef het verband tussen testresultaat en risicotoename gehandhaafd. Toen de Leidse epidemiologen, Vandenbroucke en Roosendaal de medische wereld attent maakten op deze correlatie via een publicatie in de Lancet³³ drong ons werk zelfs door tot de landelijke pers.

Gezien de mogelijke klinische, maatschappelijke, en economische consequenties trokken onze bevindingen niet alleen de aandacht van journalisten maar ook van gezondheidszorgautoriteiten³⁴, producenten van de anticonceptiepil en zelfs van beleggers op de Amsterdamse effectenbeurs. Onze waarnemingen werden echter niet alleen met enthousiasme

ontvangen. Er was ook kritiek. Deze spitste zich met name toe op de opzet van onze studie (een cross-sectional in plaats van randomized cross-over studie) en op het feit dat de klinische betekenis en de voorspellende waarde van onze APC resistentie test nog niet bewezen is³⁵⁻³⁷. We verwachten echter binnen niet al te lange tijd de belangrijkste punten van kritiek weg te nemen en hopen dat ons onderzoek op termijn een bijdrage zal leveren aan de ontwikkeling van nog veiliger orale contraceptiva en een verdere verlaging van het trombose risico van pilgebruiksters.

De betekenis van verworven APC resistentie blijft waarschijnlijk niet beperkt tot pilgebruik. Het is heel goed denkbaar dat hyperactiviteit van het stollingssysteem en verminderde gevoeligheid voor APC ook het verhoogde tromboserisico tijdens hormoonsubstitutie therapie, zwangerschap en in vitro fertilisatie behandeling zou kunnen verklaren. Daarnaast is door verschillende onderzoeksgroepen gerapporteerd dat vroegtijdige onderbreking van de zwangerschap een gevolg kan zijn van een verhoogde activiteit van het stollingssysteem. Op dit moment verrichten wij in samenwerking een aantal gynaecologische centra verder onderzoek naar de klinische betekenis van verworven APC resistentie.

De rol van de moleculaire biologie in trombose en hemostase onderzoek

Uit het voorafgaande zal U duidelijk geworden zijn dat de biochemie zich traditioneel bezighoudt met de bestudering van de functie en eigenschappen van biomoleculen in zowel modelsystemen, als binnen hun natuurlijke omgeving, het bloed, de cel of het weefsel.

De afgelopen twintig jaar is er echter een belangrijk onderzoeksgebied aan de biochemie toegevoegd en dat is de bestudering van de eigenschappen van het genetisch materiaal, het DNA, de vertaling van DNA in RNA en de synthese van eiwitten op basis van de in het DNA opgeslagen genetische informatie. De opkomst van dit onderzoeksgebied, ook wel moleculaire biologie genoemd, heeft zowel binnen de biochemie als binnen de geneeskunde geleid tot een explosieve ontwikkeling van nieuwe mogelijkheden voor onderzoek, diagnostiek en therapie.

Door de moleculair biologen zijn technieken ontwikkeld, waarmee de precieze samenstelling van het DNA bepaalt kan worden. Hierdoor is het mogelijk afwijkingen van het genetisch materiaal op het niveau van het DNA op te sporen en nieuwe methoden voor diagnostiek van erfelijke afwijkingen te ontwikkelen. Met betrekking tot de pathologie van hemostase heeft dit onder meer geleid tot een betrouwbare routine bepaling waarmee de genetische verandering die gepaard gaat met factor V_{Leiden} ondubbelzinnig kan worden aangetoond³⁸. Aangenomen mag worden dat op basis van DNA analyse in de nabije toekomst een groot aantal, tot op heden nog onbekende erfelijke afwijkingen die kunnen leiden tot hart- en vaatziekten, opgespoord zullen worden.

Daarnaast is de moleculair bioloog in staat op gerichte wijze veranderingen in het DNA aan te brengen, deze veranderde stukjes DNA in cellen in te bouwen en de gevolgen daarvan voor het organisme te bestuderen. De toepassing is niet alleen van belang voor het begrijpen van de moleculaire basis van diverse ziekteprocessen. Verwacht wordt dat het in de toekomst mogelijk zal worden bij mensen met erfelijke afwijkingen stukjes gezond DNA in lichaamscellen te importeren en tot

expressie te brengen waardoor de gevolgen van het genetische defect opgeheven worden³⁹.

De moleculaire biologie biedt ook de mogelijkheid voor de productie van natuurlijke en gemuteerde eiwitten, die zowel gebruikt kunnen worden in fundamenteel- en klinisch-wetenschappelijk onderzoek als voor directe therapeutische toepassing in de gezondheidszorg. Met betrekking tot stollingsafwijkingen en hart- en vaatziekten kunnen hier met name genoemd worden de productie van factor VIII preparaten⁴⁰ die toegediend kunnen worden aan patiënten met de erfelijke bloedingsneiging, hemofilie en van weefsel plasminogeen activator¹³, een eiwit wat na injectie in de bloedbaan bloedstolsels bij patiënten met een hartinfarct oplost.

Tenslotte maakt de moleculaire biologie het mogelijk op snelle wijze informatie te verkrijgen met betrekking tot de chemische structuur van eiwitten. Eiwitten zijn opgebouwd uit aminozuren. Deze aminozuren, er zijn 20 verschillende, zijn binnen elk eiwit in een specifieke volgorde aan elkaar gekoppeld. Afhankelijk van de grootte van het eiwit kan de lengte van de aminozuurketen variëren tussen de 100 en 2000 aminozuren. De aminozuurvolgorde legt in feite de ruimtelijke structuur van een eiwit vast en is daarmee bepalend voor zijn functionele eigenschappen.

De informatie voor de aminozuurvolgorde van elk eiwit ligt opgeslagen in het DNA en aangezien de moleculair bioloog in staat is de samenstelling van het DNA te bepalen wordt daarmee de aminozuurvolgorde van het eiwit vastgesteld.

Gebruik makend van deze aminozuurvolgorde en van röntgen-diffractie analyse kan men vervolgens de drie-dimensionale structuur van een eiwit bepalen. Inmiddels zijn de ruimtelijke

structuren van een groot aantal stollingsfactoren bekend en als voorbeeld wil ik U graag die van stollingsfactor VII_a laten zien.

Voor de leek ziet factor VII_a eruit als de provincie Limburg. Voor de biochemicus heeft deze structuur⁴¹ echter een aantal kenmerken die direct verband houden met de functionele eigenschappen van factor VII_a. Ongeveer ter hoogte van Maastricht bevindt zich het domein van factor VII_a wat verantwoordelijk is voor de binding aan negatief geladen fosfolipide oppervlakken. De cofactor van factor VII_a, weefselfactor, gaat een interactie aan met Midden-Limburg en het actieve centrum, dat is de plaats op het eiwit waar stollingsfactor X geactiveerd wordt, bevindt zich in de buurt van Weert.

Mede dank zij de door de moleculaire biologie ontwikkelde mogelijkheden krijgt de biochemicus inzicht in het directe verband tussen de structuur en de functie van eiwitten.

Met deze voorbeelden heb ik trachten aan te geven dat door de moleculaire biologie in een razendsnel tempo mogelijkheden gecreëerd worden die nog niet zo lang geleden als science fiction zouden zijn afgedaan. De betekenis van de moleculaire biologie is onderkend door het Cardiovasculair Research Instituut Maastricht, dat in zijn beleidsnotitie "Zicht op de toekomst" voorstelt middelen vrij te maken voor versterking van dit onderzoeksgebied in Maastricht.

Bij deze ontwikkeling wil ik echter wel een kanttekening plaatsen. Moleculair-biologisch onderzoek is veelal geen doel op zich maar biedt verschillende onderzoeksdisciplines de technologische mogelijkheden het genetisch materiaal te analyseren en te veranderen. Anthony Pawson, die vorige

maand de Heineken prijs voor de Biochemie en Biofysica ontving, gaf in een interview in het NRC Handelsblad aan⁴² dat binnen afzienbare tijd alle 60- tot 100.000 genen van de mens in kaart zullen zijn gebracht. Volgens Pawson begint de aandacht echter nu al te verschuiven in de richting van de producten van deze genen, de eiwitten en de wijze waarop deze zich binnen cellen en weefsels organiseren tot een supra-moleculaire machine. Naar zijn mening zal de uitdaging voor de biochemie in de toekomst zijn de taal van het eiwit te ontrafelen, dat wil zeggen na te gaan op welke wijze de eiwitten op moleculair niveau met elkaar communiceren. De klassieke biochemie zal hiertoe de benodigde antwoorden dienen te verschaffen en dit betekent dat er in de toekomst in toenemende mate een beroep gedaan zal worden op de klassiek geschoolde biochemicus.

Trombose en Hemostase onderzoek in Nederland

Uit het voorgaande mocht U mogelijk de indruk gekregen hebben dat de biochemische benadering van de bloedstolling uniek is voor Maastricht. Dit is echter niet het geval. Hemostase en trombose onderzoek in Nederland is gebaseerd op een lange traditie. Naast Maastricht zijn er onder meer belangrijke onderzoekscentra in Amsterdam, Leiden en Utrecht.

In deze centra bestaat een aanzienlijk deel van de wetenschappelijke staf uit biochemici. Een globale analyse leert dat in Nederland ongeveer 70% van de academisch opgeleide onderzoekers werkzaam in fundamenteel trombose en hemostase onderzoek een biochemische of daaraan nauw verwante opleiding genoten hebben. Niet alleen leveren in ons land biochemici een belangrijke bijdrage aan het stollingsonderzoek, maar internationaal gezien neemt Nederland ook een prominente plaats in in dit onderzoeksgebied.

Tijdens het laatste congres van de International Society of Thrombosis and Haemostasis in Florence gaf de president van het congres een overzicht van de bijdrage van verschillende landen aan het congresprogramma. Nederland nam hierin zowel in kwalitatieve als kwantitatieve zin een vooraanstaande plaats in. In de cijfermatige beoordeling van de kwaliteit van de ingezonden abstracts door de reviewers kwam Nederland op de eerste plaats. Ons land leverde ook in kwantitatieve zin een belangrijke bijdrage aan dit congres. Gerekend naar het aantal lezingen kwam Nederland achter een aantal grote landen op de vijfde plaats. Zonder afbreuk te doen aan de betekenis van klinici in ons vakgebied, hoop ik hiermee aangegeven te hebben dat biochemisch onderzoek van de bloedstolling niet de hobby van een enkeling is maar een wezenlijke bijdrage levert aan onze inzichten in trombose en hemostase.

Biochemie onderwijs aan de Medische Faculteit

De werkzaamheden van de universitaire academicus blijven niet beperkt tot wetenschappelijk onderzoek. Het geven van onderwijs vormt een belangrijk onderdeel van het takenpakket van de academisch geschoolde medewerker. Gezien de steeds meer op moleculaire basis gerichte diagnostische- en therapeutische benadering van de geneeskunde is er in het onderwijs aan een Medische Faculteit een belangrijke taak voor de biochemicus weggelegd. Vanuit de biochemie behoort de student inzicht te krijgen in de eigenschappen van biomoleculen, hoe deze zich in het lichaam rangschikken tot macromoleculaire structuren en wat de betekenis hiervan is voor het functioneren van cellen en weefsels onder zowel normale als pathologische omstandigheden. Deze ontwikkeling en de toenemende studenten aantallen aan de Medische

Faculteit in Maastricht in overweging nemende, wekt het bevreemding dat de onderwijsformatie van de capaciteitsgroep Biochemie de laatste jaren geleidelijk afgenomen is. Ik hoop dat deze tendens zich niet doorzet aangezien dit ten koste zou kunnen gaan van zowel de kwaliteit als van de noodzakelijke vernieuwing van het biochemie onderwijs aan onze faculteit.

Slotwoord

Hiermee ben ik gekomen aan het eind van het inhoudelijke deel van mijn oratie, waarin ik U ervan heb trachten te overtuigen dat U uw hele leven afhankelijk bent van een goed werkend stollingssysteem. Ik ben begonnen met de opmerking dat vrijwel iedereen, zonder zich bewust te zijn van de complexiteit van stollingsproces, het als volkomen normaal beschouwt dat bloedingen in de meeste gevallen binnen enkele minuten tot stilstand gebracht worden. Na 20 jaar onderzoek in de bloedstolling verbaast mij dit ook niet meer, we beschikken immers over een efficiënt systeem om een lek in een bloedvat te dichten. Dit systeem is echter niet alleen levensreddend doch ook levensbedreigend. Een te goed werkend stollingssysteem leidt tot ongewenste vorming van stolsels en trombose. Ook dit is voor de onderzoeker van de bloedstolling volkomen begrijpelijk.

Mogelijk wek ik met deze opmerkingen de indruk dat het trombose en hemostase proces geen geheimen meer kent en vraagt U zich misschien af waarom het nog steeds nodig is dat de bloedstolling onderzocht wordt. Hier kan ik een eenvoudig antwoord op geven. Op basis van onze huidige kennis voltrekt zich in onze bloedvaten elke dag weer een wonder. Gezien het gemak waarmee de bloedstolling op gang komt tijdens experimenten in reageerbuizen is het verbazingwekkend dat onze bloedvaten niet bij de minste of geringste vaatwand-

beschadiging met fibrine dichtslibben. Ondanks de overweldigende hoeveelheid informatie die beschikbaar is m.b.t. de kinetiek en het mechanisme van de individuele reacties van de bloedstolling zijn wij nog niet in staat deze kennis te integreren en hebben we nog betrekkelijk weinig inzicht in de fijnregulatie van het stollingsproces wanneer het bloed zich in zijn natuurlijke omgeving, het bloedvat, bevindt. Pas wanneer we precies begrijpen hoe de afzonderlijke reacties van de bloedstolling in het bloed op elkaar afgestemd worden, zullen we in staat zijn op verantwoorde wijze in te grijpen in het stollingsproces en de hemostase balans te herstellen bij patiënten met trombotische complicaties.

Hiervoor is het nodig dat de stollingsbiochemicus zijn onderzoeksterrein verlegt van modelsystemen naar bloed, een ontwikkeling die enige tijd geleden door Professor Hemker in ons laboratorium in gang is gezet. Ik hoop in het kader van mijn benoeming tot hoogleraar in de Enzymologie van Trombose en Hemostase een bijdrage te leveren aan het overbruggen van de kloof tussen fundamenteel en klinisch stollingsonderzoek.

Dankwoord

Als slot van deze rede wil ik graag een dankwoord uitspreken. Allereerst wil ik de Rector Magnificus, het College van Bestuur, het bestuur van de Faculteit der Geneeskunde en de Stichting Wetenschapsbeoefening Universiteit Maastricht bedanken voor het in mij gestelde vertrouwen.

Grote erkentelijkheid wil ik betuigen jegens het bestuur van CARIM, in het bijzonder de hooggeleerden Reneman en Struijker Boudier, voor de mogelijkheden die dit instituut mij de afgelopen 10 jaar geboden heeft om mijn wetenschappelijke ambities te verwezenlijken.

De medewerkers van de vakgroep Biochemie, met name de door mij begeleide promovendi Jan van Rijn, Han Speijer, Harry Bakker, José Govers, Gerry Nicolaes, Lico Hoekema en Joyce Curvers en mijn laboratoriummedewerkster Stella Thomassen ben ik dank verschuldigd voor het enthousiasme waarmee zij de problemen samenhangend met het onderzoek aangepakt hebben.

Vervolgens wil ik mij richten tot een aantal mensen, die een belangrijke rol hebben gespeeld in mijn vorming tot wetenschappelijk onderzoeker.

Hooggeleerde Slater, ik beschouw het als een eer als promovendus gewerkt te hebben voor de vader van de Nederlandse Biochemie. De betekenis die U gehad heeft voor mijn wetenschappelijke ontwikkeling is niet in woorden uit te drukken. Met veel plezier denk ik terug aan de periode dat ik onder uw leiding aan mijn promotie-onderzoek gewerkt heb. U bent voor mij de afgelopen 30 jaar niet veranderd en ik vertrouw erop dat U ook aanwezig zult zijn bij mijn afscheidscollege.

Prof. Boyer kon wegens verplichtingen deze middag helaas niet aanwezig zijn. Ik ben er trots op dat ik in de gelegenheid geweest ben voor een Nobelprijswinnaar te werken en de anderhalf jaar die ik in uw laboratorium in Los Angeles gewerkt heb behoren tot de meest productieve en creatieve perioden in mijn loopbaan.

Hooggeleerde Hemker, beste Coen. Tijdens de voorbereiding van deze oratie is mij weer eens duidelijk geworden welk een vooruitziende blik je had toen je in het begin van de jaren zestig besloot de bloedstolling vanuit een biochemische invalshoek te benaderen. Bijzondere waardering heb ik voor het feit dat je mij altijd volledige vrijheid hebt gegeven in mijn onderzoek, er

onderwijl voor zorgend dat je dit van afstand op de juiste momenten in de goede richting stuurde.

Hooggeleerde Zwaal, beste Rob. Dank zij jouw ga ik in de stollingswereld door voor fosfolipiden expert. Onze samenwerking op het gebied van de rol van fosfolipiden en biomembranen in stolfactor activering is voor mij van onschatbare waarde geweest.

Ik heb de afgelopen jaren met een aantal laboratoria in buitenland vruchtbaar samengewerkt.

Dear Professor Griffin, dear John the four sabattical leaves that I spend at the Scripps Institute in La Jolla are memorable and I thank you for the fact that you convinced us already in 1985 that the protein C system should become part of our research program in Maastricht.

Professor Schwarz, dear Peter, in the spring of 1994 we started a cooperation on APC resistance and factor V_{Leiden}. This meant a switch of our reseach program, which opened a totally new research area in my laboratory.

Zeergeleerde Tans, beste Guido. Ik weet dat je liever niet hebt dat ik je in dit dankwoord betrek. Ik ben er echter van overtuigd dat zonder jou mijn wetenschappelijke carrière er heel anders uitgezien zou hebben. Al meer dan 20 jaar werken wij zeer intensief samen en het feit dat ik hier sta geeft aan hoe belangrijk onze samenwerking is. We verschillen wel eens van mening, maar in de vele dagen en nachten die wij samen achter waterbad en spectrofotometer doorgebracht hebben zijn we het over een ding eens geworden: de Universiteit Maastricht is niet het enige waar Limburg trots op kan zijn.

Tenslotte mijn familie en mijn gezin.

Helaas heeft mijn vader deze dag niet mee mogen maken. Het verheugt mij echter dat mijn moeder vandaag aanwezig is. Lieve moeder, jullie persoonlijke belangstelling en opoffering zijn van zeer groot belang geweest in de beginperiode van mijn academische opleiding.

Mijn laatste dankwoord gaat uit naar mijn gezin. Sjoukje, eindelijk kan ik eens in het openbaar uitspreken dat jij in feite degene bent die dit alles mogelijk gemaakt heeft. Al jarenlang ben je deelgenoot van de hoogte- en dieptepunten in het leven van een wetenschapper wiens beroep een hobby geworden is. Na alles wat ik gezegd heb is mijn woordenschat ontoereikend om tot uitdrukking te brengen hoeveel dank ik jou verschuldigd ben. Muriël en Justin, jullie zijn inmiddels al gewend aan een vader die vaak niet aanspreekbaar is. Ik hoop echter dat jullie nooit zullen ophouden mij duidelijk te maken dat wetenschap niet het enige in het leven is en dat jullie aandacht zullen blijven vragen.

Ik heb gezegd.

Literatuur

1. Virchow, R. Die Cellular Pathologie. Verlag von August Hirschwald, Berlin 1859
2. Morawitz, P. Beiträge zur Kenntniss der Blutgerinnung. Dtsch. Arch. Klin. Med. 79 (1903-1904) pp. 1-28, 215-233, 432-442
3. Bizzozzero, J. Über einen neuen Formbestandteil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und der Blutgerinnung. Arch. Pathol. Anat. 90 (1882) 261-332
4. Bevers, E.M., Comfurius, P., van Rijn, J.L.M.L., Hemker, H.C., Zwaal, R.F.A. Generation of prothrombin-converting activity and exposure of phosphatidylserine at the outer surface of platelets. Eur. J. Bioch. 122 (1982) 429-436
5. Coughlin, S.R. Thrombin receptor structure and function. Thromb. Haemost. 70 (1993) 184-187
6. MacFarlane, R.G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biological amplifier. Nature 202 (1964) 498-499
7. Davie, E.W., Ratnoff, O.D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. Science 145 (1964) 1310-1312
8. Hemker, H.C., Esnouf, M.P., Hemker, P.W., Swart, A.C.W., MacFarlane, R.G. Formation of prothrombin converting activity. Nature 215 (1967) 248-251
9. Silverberg, S.A., Nemerson, Y., Zur, M. Kinetics of the activation of bovine coagulation factor X by components of the extrinsic pathway. Kinetic behavior of two-chain factor VII in the presence and absence of tissue factor. J. Biol. Chem. 252 (1977) 8481-8488

10. Nesheim, M.E., Taswell, J.B., Mann, K.G. The contribution of bovine factor V and factor Va to the activity of prothrombinase. *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 10952-10962
11. Rosing, J., Tans, G., Govers Riemsdag, J.W.P, Zwaal, R.F.A., Hemker, H.C. The role of phospholipids and factor Va in the prothrombinase complex. *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 274-283.
12. van Dieyen, G., Tans, G., Rosing, J., Zwaal, R.F.A., Hemker, H.C. The role of phospholipid and factor VIIIa in the activation of bovine factor X. *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 3433-3442
13. Collen, D., Lijnen, H.R. Molecular Basis of fibrinolysis, as relevant for thrombolytic therapy. *Thromb. Haemost.* 74 (1995) 167-171
14. Abilgaard, U. Binding of thrombin to antithrombin III. *Scand. J. Lab. Invest.* 24 (1969) 23-27
15. Bayston, T.A., Lane, D.A. Antithrombin: molecular basis of deficiency. *Thromb. Haemost.* 78 (1997) 339-343
16. Stenflo, J. A new vitamin K-dependent protein. Purification from bovine plasma and preliminary characterization. *J. Biol. Chem.* 251 (1976) 355-363.
17. Walker, F.J. Regulation of activated protein C by protein S. The role of phospholipid in factor Va inactivation. *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 1128-1131
18. Griffin, J.H., Evatt, B., Zimmerman, T.S., Kleiss, A.J., Wideman, C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J. Clin. Invest.* 68 (1981) 1370-1373
19. Schwarz, H.P., Fischer, M., Hopmeier, P., Batard, M.A., Griffin, J.H. Plasma protein S deficiency in familial thrombotic disease. *Blood* 64 (1984) 1297-1300

20. Dahlbäck, B., Carlsson, M., Svensson, P.J. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 1004-1008
21. Mead, T.W., Miller, G.J., Rosenberg, R.D. Characteristics associated with the risk of arterial thrombosis. In: *Cardiovascular Thrombosis*. Ed. Verstraete, M., Fuster, V., Topol, E.J. Lipincott-Raven, Philadelphia-New York (1998) 77-90
22. Bertina, R.M., Koeleman, B.P.C., Koster, T., Rosendaal, F.R., Dirven, R.J., De Ronde, H., Van der Velden, P.A., Reitsma, P.H. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 369 (1994) 64-67
23. Greengard, J.S., Sun, X., Xu, X., Fernandez, J.A., Griffin, J.H., Evatt, B. Activated protein C resistance caused by Arg506Gln mutation in factor Va. *Lancet* 343 (1994) 1361-1362
24. Voorberg, J., Roelse, J.C., Koopman, R., Büller, H.R., Berends, F., Ten Cate, J.W., Mertens, K., Van Mourik, J.A. Association of idiopathic venous thromboembolism with single point-mutation at Arg506 of factor V. *Lancet* 343 (1994) 1535-1536
25. Zoller, B., Dahlbäck, B. Linkage between inherited resistance to activated protein C and factor V gene mutation in venous thrombosis. *Lancet* 343 (1994) 1536-1538
26. Nicolaes, G.A.F., Thomassen, M.C.L.G.D., Tans, G., Rosing, J., Hemker, H.C. Effect of activated protein C on thrombin generation and on the thrombin potential in the

- plasma of normal and APC resistant individuals. *Blood Coag. Fibr.* 8 (1997) 28-38
27. WHO. Effect of different progestagens in low oestrogen oral contraceptives on venous thromboembolic disease. World Health Organization Collaborative Study of Cardiovascular Disease and Steroid Hormone Contraception. *Lancet* 346 (1995) 1582-1588
 28. WHO. Venous thromboembolic disease and combined oral contraceptives: results of international multicentre case-control study. World Health Organization Collaborative Study of Cardiovascular Disease and Steroid Hormone Contraception. *Lancet* 346 (1995) 1575-1582
 29. Jick, H., Jick, S.S., Gurewich, V., Myers, M.W., Vasilakis, C. Risk of idiopathic cardiovascular death and nonfatal venous thromboembolism in women using oral contraceptives with differing progestagen components. *Lancet* 346 (1995) 1589-1593
 30. Bloemenkamp, K.W.M., Rosendaal, F.R., Helmerhorst, F.M., Büller, H.R., Vandenbroucke, J.P. Enhancement by factor V Leiden mutation of risk of deep- vein thrombosis associated with oral contraceptives containing third-generation progestagen. *Lancet* 346 (1995) 1593-1596
 31. Spitzer, W.O., Lewis, M.A., Heinemann, L.A., Thorogood, M., MacRae, K.D. Third generation oral contraceptives and risk of venous thromboembolic disorders: an international case-control study. Transnational Research Group on Oral Contraceptives and the Health of Young Women. *B.M.J.* 312 (1996) 83-88
 32. Rosing, J., Tans, G., Nicolaes, G.A.F., Thomassen, M., van Oerle, R., van der Ploeg, P., Heijnen, P., Hamulyak, K., Hemker, H.C. Oral contraceptives and venous thrombosis:

- Different sensitivities to activated protein C in women using second- and third-generation oral contraceptives. *Br. J. Haematol.* 97 (1997) 233-238
33. Vandenbroucke, J.P., Rosendaal, F.R. End of the line for "third-generation-pill" controversy? *Lancet* 349 (1997) 1113-1114
 34. Alexandere, J.M., Strandberg, K. EMEA and third-generation oral contraceptives. *Lancet* 350 (1997) 290
 35. Schramm, W., Heinemann, L.A.J. Oral contraceptives and venous thromboembolism: Acquired APC resistance? *Br. J. Haematol.* 98 (1997) 491
 36. Spitzer W.O. The 1995 pill scare revisited: anatomy of a non-epidemic. *Hum. Reprod.* 12 (1997) 2347-2357
 37. Winkler, U.H. Blood Coagulation and Oral Contraceptives. A Critical Review. *Contraception* 57 (1998) 203-209
 38. Beauchamp, N.J., Daly, M.E., Cooper, P.C., Preston, F.E., Peake, I.R. Rapid two-stage PCR for detecting factor V G1691A mutation. *Lancet* 344 (1994) 694-695
 39. Mulligan, R.C. The basic science of gene therapy. *Science* 260 (1993) 926-932
 40. Schwartz, R.S. Abilgaard, C.F., Aledort, L.M. Arkin, S. Bloom, A.L. et al. Human recombinant DNA-derived antihemophilic factor (factor VIII) in the treatment of hemophilia A. *N. Engl. J. Med.* (1990) 323 1800-1805
 41. Banner, D.W., D'Arcy, A., Chène, C., Winkler, F.K., Guha, A., Konigsberg, W.H., Nemerson, Y., Kirchofer, D. The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor. *Nature* 380 (1996) 41-46
 42. Interview met Dr. A. Pawson, *NRC Handelsblad*, 3 oktober 1998, p. 51